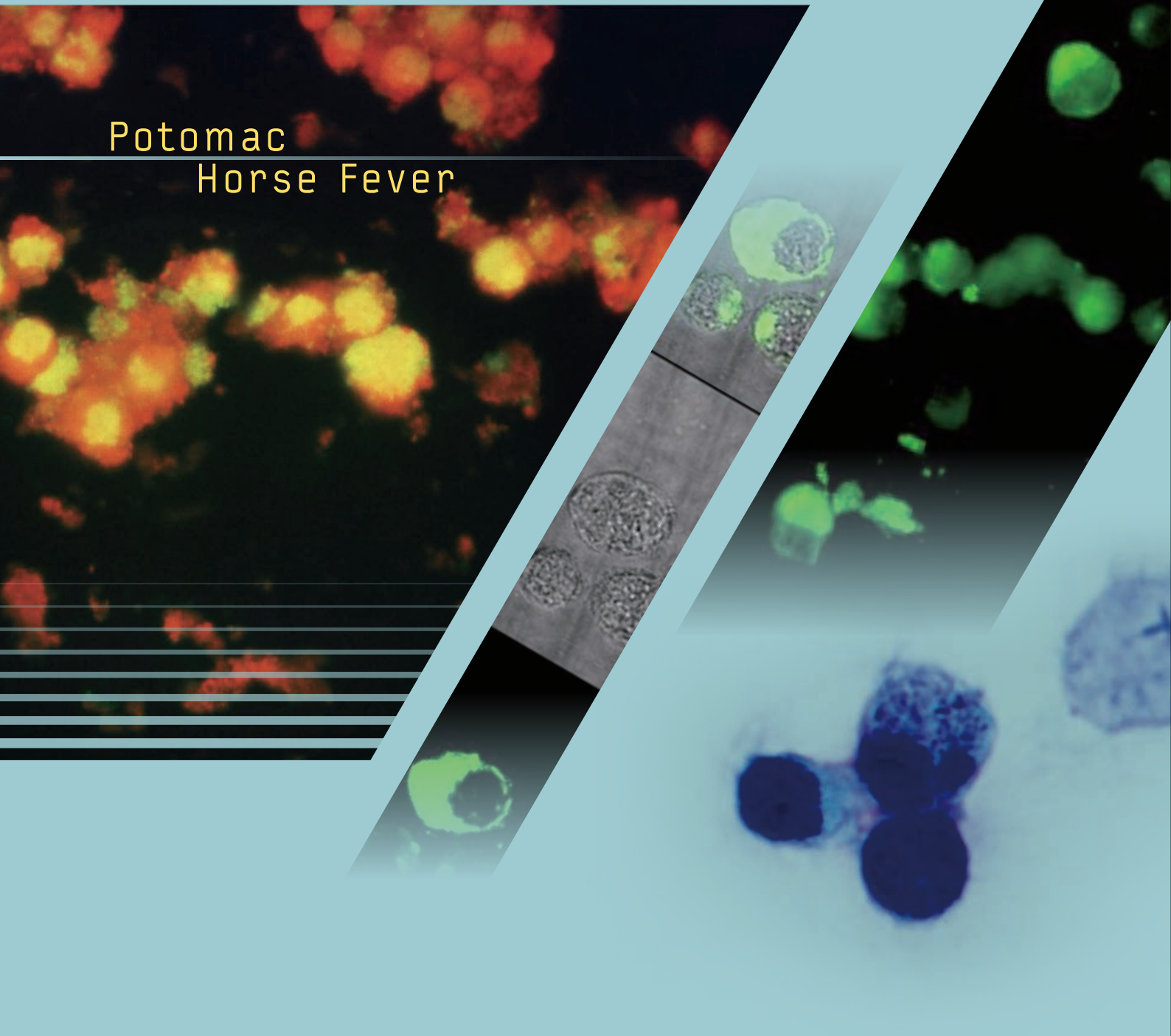


# 馬のポトマック熱

Potomac  
Horse Fever



## 目 次

発刊にあたって	1
馬のポトマック熱要約	2
馬のポトマック熱について	3
I. 発生の歴史と分布	3
1. 発生の歴史	
2. 分 布	
3. 発生要因ならびにベクターの調査	
II. 臨 床	6
1. 臨床症状	
2. 血液学的所見	
3. 類症鑑別	
III. 物理学的所見	8
1. 肉眼所見	
2. 病理組織学的所見	
IV. 病原体	10
1. 分離と培養	
2. 形 態	
3. 血清学的性状	
4. 病原性	
V. 診 断	12
1. 病原学的診断	
2. 血清学的診断	
VI. 治療と予防	16
1. 治 療	
2. 予 防	
おわりに	17

## 発刊にあたって

馬のポトマック熱 (Potomac Horse Fever : PHF) は、アナプラズマ科ネオリケッチア属 *Neorickettsia risticii* (*N. risticii*) によって引き起こされる急性の感染症で、2005年にリケッチア全体の分類が変わるまでは、*Ehrlichia risticii* (*E. risticii*) という名前の病原体でした。発熱、疝痛、下痢、蹄葉炎などを主徴とし、死亡率 (淘汰も含む) は30%に達する疾病です。PHFは、1979年に初めて報告された馬属特有の疾病であり、当初の発生地域は米国東部のポトマック川流域に限られていました。しかし、その後、1986年オハイオ州の競馬場とその周辺牧場に発生し、さらに血清疫学的調査において抗体陽性馬が、米国のみならず近隣諸国に広く存在していることが明らかにされました。

当時、PHFの感染経路は不明であったため、日本中央競馬会は、PHFの侵入に備え、1987～1988年にかけて、米国オハイオ州立大学の獣医学部に和田隆一氏を派遣し、防疫・予防を主とした実地研修と研究を行いました。現地でおこなった実験ならびに調査成績は、軽種馬防疫協議会が監修する馬感染症シリーズの冊子として平成2年にまとめられました。

初版から30年が経過して、本疾病の実態は明らかになりつつあり、遺伝子検査法を用いた診断も行われています。

この第2版は、日本中央競馬会、競走馬総合研究所の全面的協力を得て近年明らかになってきた本病の概要を追加し、改訂したものです。御協力に敬意を表するとともに、本冊子をご活用いただき、本病の理解の一助となれば幸いです。

令和2年12月

公益社団法人 中央畜産会

# 馬のポトマック熱要約

馬のポトマック熱 (Potomac Horse Fever : PHF) は、アナプラズマ科ネオリケッチア属 *Neorickettsia risticii* (*N. risticii*) によって引き起こされる急性の感染症で、発熱、疝痛、下痢、蹄葉炎などを主徴とする疾病である。*N. risticii* が、主として血液中の単球に感染することから馬単球性エリキア症 (Equine monocytic ehrlichiosis) と呼ばれることもある。PHF は、1979 年に急性下痢症候群として初めて報告された馬属特有の病気である。

当初、この病気は、米国東部のメリーランド州モントゴメリー郡において地方病的に発生した。以後、毎年メリーランド州とバージニア州を流れるポトマック川の流域で多くの罹患馬が認められた。しかし、その後の血清疫学的調査により本病はかならずしもポトマック川流域の風土病ではないことが明らかになり、現在までに、米国の全州とカナダのオンタリオ、ケベックおよびアルバータ州で抗体陽性馬が検出されている。PHF は、馬の品種、性別を問わず感染するが、幼若令馬では発生がきわめて少ない。本病は、5 月から 11 月にかけて発生し、夏期とくに 7 月と 8 月に多発する。おもな発生は、ポトマック川やオハイオ川など河川流域の原野にみられる。流行形態は散発的で、馬から馬への直接的な伝播は報告されていない。近年、PHF の伝播に *N. risticii* が感染した吸虫の関連が判明しており、吸虫が寄生した水生昆虫の誤摂取 (水桶あるいは飼葉桶への混入、等) が主原因とされている。

臨床症状は、沈鬱、食欲廃絶、発熱、下痢、疝痛、脱水症、蹄葉炎などである。適切な処置が施されないと予後は悪く、死亡率 (淘汰も含む) は

約 30% である。妊娠馬では、流産の誘因にもなることもある。馬のサルモネラ感染症および X 大腸炎など、急性下痢を呈する疾病との鑑別が重要である。

病理学的な肉眼的病変は、ほぼ盲腸と大結腸に限られる。粘膜の主な病変は充血および出血である。病理組織学的には、盲腸および結腸の粘膜上皮細胞の変性・壊死・脱落、腸陰窩における上皮細胞や炎症細胞塊を含む小壊死巣形成などが認められる。粘膜固有層には、多数の好中球、マクロファージ、肥満細胞、形質細胞、リンパ球、好酸球の浸潤がみられる。

*N. risticii* の分離と培養には、マウスのマクロファージ系腫瘍由来 P388D1 細胞などが用いられている。培養細胞中に増殖する *N. risticii* は、光学顕微鏡下で観察され、ライトギムザ染色で青紫色に染まる。電子顕微鏡観察では、2 層の細胞膜と波状の外膜を有し、グラム陰性菌の形態を示す。大きさは、 $0.4-0.75\mu\text{m} \times 0.5-1.2\mu\text{m}$  である。PHF の確定診断には、病原学的または血清学的診断が用いられる。病原学的診断は細胞培養法、マウス接種法もしくは PCR 検査によって行われる。細胞培養法やマウス接種法では、分離された病原体の同定に間接蛍光抗体法による免疫学的診断が必要である。野外例の血清学的診断には、間接蛍光抗体法が用いられている。

治療の基本は、テトラサイクリン系抗生物質の投与と対症療法としての補液、鎮痛・解熱剤の投与である。予防は、海外では不活化ワクチンが市販されているが、効果は高いとは言えない。夜間の馬房内消灯など水生昆虫の摂取を最小限にする厩舎衛生害虫の防除対策が行われている。

# 馬のポトマック熱について

## I 発生の歴史と分布

### 1. 発生の歴史

PHFは、1979年に急性下痢症候群として初めて報告された馬属特有の病気である。当初、この病気は、米国東部のメリーランド州モンゴメリー郡において地方病的に発生した。その後、毎年メリーランド州とバージニア州を流れるポトマック川の流域で多くの罹患馬が認められたことから、馬のポトマック熱と呼ばれるようになった。メリーランド州における本病の発生状況を見てみると、1979～1987年までの間に873頭が罹患しそのうちの147頭が死亡している（表1）。

表1 米国メリーランド州における馬のポトマック熱の発生例数と死亡率\*

年	症例数	死亡例数 (%)
1979	8	2 (25.0)
1980	20	5 (25.0)
1981	36	12 (33.3)
1982	113	28 (24.8)
1983	116	42 (36.2)
1984	109	18 (16.5)
1985	116	8 (6.9)
1986	262	21 (8.0)
1987	93	11 (11.8)

\*：ラテックス凝集反応による診断が行われた。非特異反応による陽性例が多数含まれていると考えられる。

### 2. 分布

当初の発生地域は、ポトマック川流域に限られていたため、未知の疾病と考えられた。一方、カナダのオンタリオ州では同様の症状を示す症例の報告があったものの、原因は不明となっ

いた。その後の血清疫学的調査により、本病は、米国の他の州や、カナダのオンタリオ州にも存在することが証明され、かならずしもポトマック川流域の風土病ではないことが明らかになった。オハイオ州シンシナティー市にあるリバー・ダウンス競馬場では、1986年の調査において1500頭の在厩競走馬のうち約60%が抗体を保有していた。また、さかのぼって調査してみると、毎年、約75頭の馬が罹患し、これまでに12～20頭が本病によって死亡したと推定される。抗体陽性馬は米国のほぼ全域、カナダ諸州で存在しており、メキシコ、パラグアイ等の近隣諸国でも本病の存在が疑われた（なお、最近の研究では血清学的診断（間接蛍光抗体試験）において高率に偽陽性が確認されており、真の地理的分布範囲は不明である）。

細胞培養による菌分離やPCR法などの病原学的な手法を用いて確認された臨床例は、米国では、カリフォルニア、イリノイ、インディアナ、ケンタッキー、メリーランド、ミシガン、ニューヨーク、ニュージャージー、オハイオ、オレゴン、ペンシルバニア、テキサス、ミネソタ、ニューハンプシャーおよびバージニアで報告されている。米国以外では、カナダのオンタリオ州で数多く認められ、欧州（フランス、オランダ）、南米（ウルグアイ、ベネズエラ）インド、オーストラリアでも単球性エリキア症の散発的な報告がある。

Equine Disease Quarterlyによる最近の動向では、2018年にケンタッキー州だけで26例（内、死亡例6例）、2019年に25例（ケンタッキー州で7例）の流行が報告されており、2018、19年ともに2例の流産が確認されてい

る (表 2)。2019 年には、ブラジルのリオデジヤネイロで発生報告がある。力久博士によると、2020 年にはオハイオ州立大学で 36 例の陽性例があり、カナダのオンタリオ州では nested

PCR 法で 33 例の陽性例が確認されている。一方、日本では、JRA が 12 例の重度の下痢症に Real-time PCR 法を実施したが、*N. risticii* は現在のところ確認されていない。

表 2 近年の PHF 発生情報 (Equine Disease Quarterly 調べ)

年	症例数	概要
2019	27 ~	3 州で発生。ケンタッキー州は 7、8 月が最多。 2 例はケンタッキー州の流産例
2018	28 ~	5 州で発生。ケンタッキー州で最も多く 26 例 (6 例死亡)。2 例は流産例
2017	27 ~	ケンタッキー州で 27 例
2016	6 ~	メリーランド州およびウエストバージニア州で 3 例

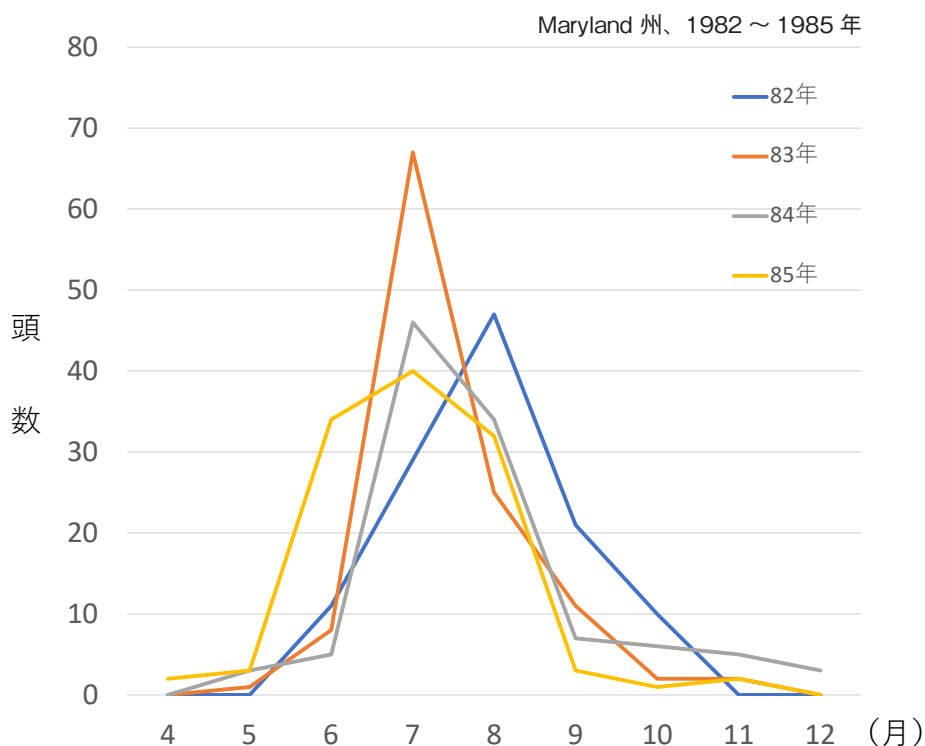
\*第 3、4 四半期に報告されているもののみを記載。実際はもっと多い。

### 3. 発生要因ならびにベクターの調査

PHF は、馬の品種、性別を問わず感染するが、幼若令馬では発生がきわめて少ない。本病は、5 月から 11 月にかけて発生し、夏期とくに 7 月と 8 月に多発する (図 1)。おもな発生は、ポトマック川やオハイオ川など河川流域の原野にみられる。流行形態は散発的で、馬から馬への直接的な伝播はない。このような事実に加え、本病は、感染発症馬の急性期の血液を実験馬の

皮下または静脈内に接種して発症させることができることや、ヒトや動物のリケッチア病の大部分が節足動物を介して哺乳類や鳥類に感染することなどから、ベクターを介して伝播される疾病である可能性が指摘されていた。当初は、マダニがベクターとして考えられていたが、現在は、水生昆虫等の介在により、*N. risticii* が感染した吸虫からの伝搬が、PHF の主な発症要因として明らかになっている。

図 1 馬のポトマック熱の月別発生頭数



## ● *N. risticii* の感染環と感染経路

吸虫と哺乳類に感染する *N. risticii* の複雑な感染環を図2に示す。*N. risticii* の感染した吸虫卵は、水中で孵化しミラシジウムとなり、淡水巻貝に寄生する。ミラシジウムは、貝内でスポロシストに発育し、温暖期に巻貝からセルカリアとして放出される。セルカリアは、水生昆虫の幼虫に寄生し、虫体内でメタセルカリアへと発育する。羽化した水生昆虫は、コウモリや鳥が捕食して吸虫の終宿主となり、それらの糞から吸虫卵が水辺に排出される。*N. risticii* のDNAは、巻貝の吸虫、あるいはトビケラ（トビケラ目）、カゲロウ（カゲロウ目）、イトトンボ（トンボ目、均翅亜目）、トンボ（トンボ目、不均翅亜目）、カワゲラ（カワゲラ目）など13種類の幼虫あるいは成虫から検出されており、*N. risticii* が感染したトビケラを用いた馬への伝播検証では、臨床症状が再現されている。馬への暴露ルートは、水生昆虫の偶発的な摂取（桶あるいは敷料への混入、水辺で草を食む際の誤食等）が主因と考えられている。カゲロウが異

常発生した地域で行われた乗馬大会で、PHF が集団発生したという事例もある。淡水からの暴露の可能性はまだ否定されていない。

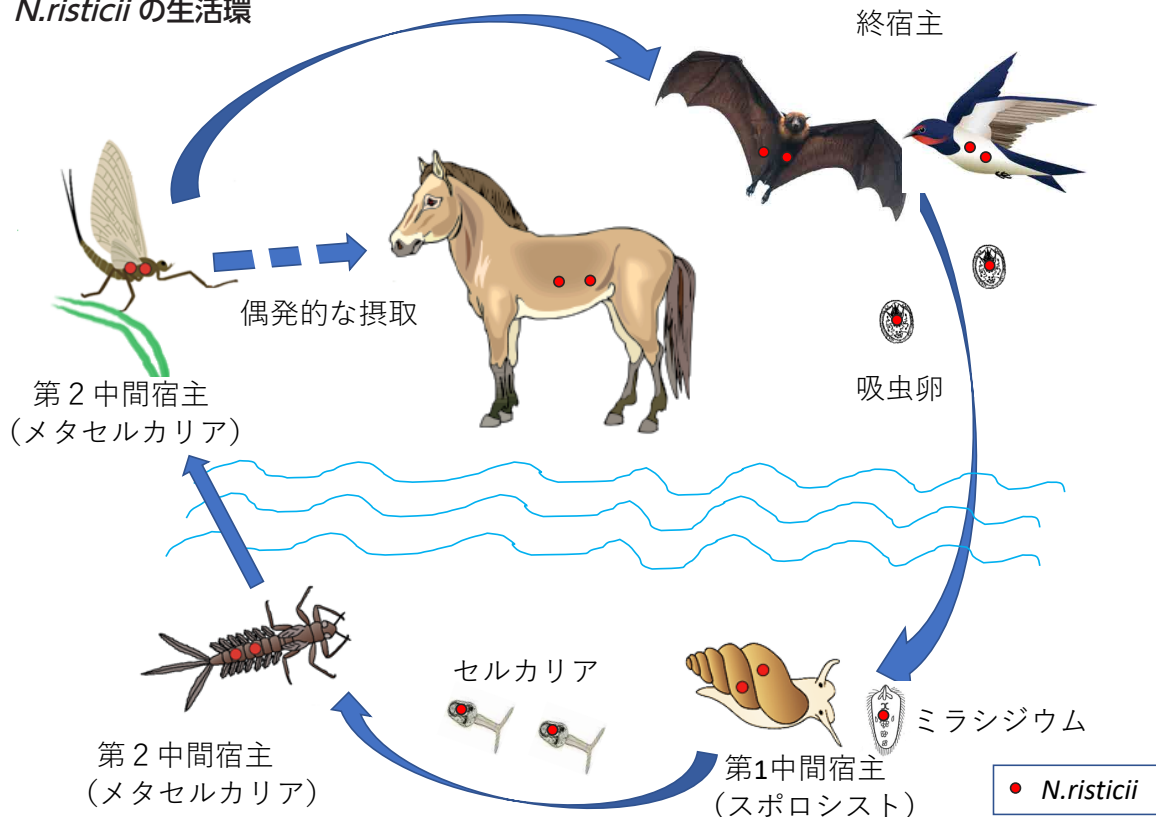
一方、水生昆虫を捕食するコウモリやツバメからも *N. risticii* のDNAが検出されており、*N. risticii* のリザーバーと運び屋の役目を果たしている。巻貝の調査では、近縁の *Neorickettsia* sp. が、アジア、ヨーロッパ、南アメリカ等世界各地で検出されており、韓国の巻貝からは、*N. risticii* が確認されたという報告もある。

*N. risticii* は、馬の糞便中にも多数排泄されるが、馬房汚染による経口感染については不明である。臨床的には罹患馬からの伝播はないと言われている。

また、実験的に感染させた妊娠馬の胎児から *N. risticii* が分離されたことから、本病の垂直伝播の可能性が指摘されており、近年、流産も確認されている。

2020年には、新種の *Neorickettsia* によってPHFの症状を示すことが報告されており、PHFの病態解明にはさらなる研究が必要である。

図2 *N.risticii* の生活環



## Ⅱ 臨床

### 1. 臨床症状

自然感染馬に認められる臨床症状は、沈鬱、食欲廃絶、発熱、下痢、疝痛、脱水症、蹄葉炎などである(表3、写真1～3)。実験感染馬では、接種後3～11日の潜伏期間を経てまず沈鬱となり、食欲が減退する。前後して、38.9℃～41.6℃の範囲の発熱が認められ、3～8日間稽留する(図3)。下痢は、初期症状

が認められてから24時間～48時間後に始まることが多く、1日～10日間(通常3～5日間)持続する。下痢は、本病の特徴的所見の一つではあるがすべての症例で認められるわけではない。軟便程度のこともあるが、多くの場合は黄土色で水様性の激しい下痢であり、末期には脱水症状をきたす。もう一つの特徴的所見である蹄葉炎は、20-30%の馬で見られ、下痢が起きてから3日以内に発症することが多い。また、疝痛は、しばしば急性で激しく、腸の蠕動は減退あるいは停止するが、下痢の発症時には亢進することもある。時折、一過性の発熱と元気消失のみで耐過する症例や、発熱を示さない不顕性感染も認められる。適切な処置が施されないと予後は悪く、死亡率(淘汰も含む)は、約30%である。妊娠馬の胎仔に感染した場合



写真1 疝痛症状を呈する自然感染馬

は、胎盤炎や胎盤停滞を発症して流産の誘因となる。流産胎仔には、腸間膜リンパ節および脾臓のリンパ過形成や門脈周囲性肝炎、大腸炎がみられることもある。



写真2 実験感染馬に見られた下痢

表3 馬のポトマック熱の臨床所見

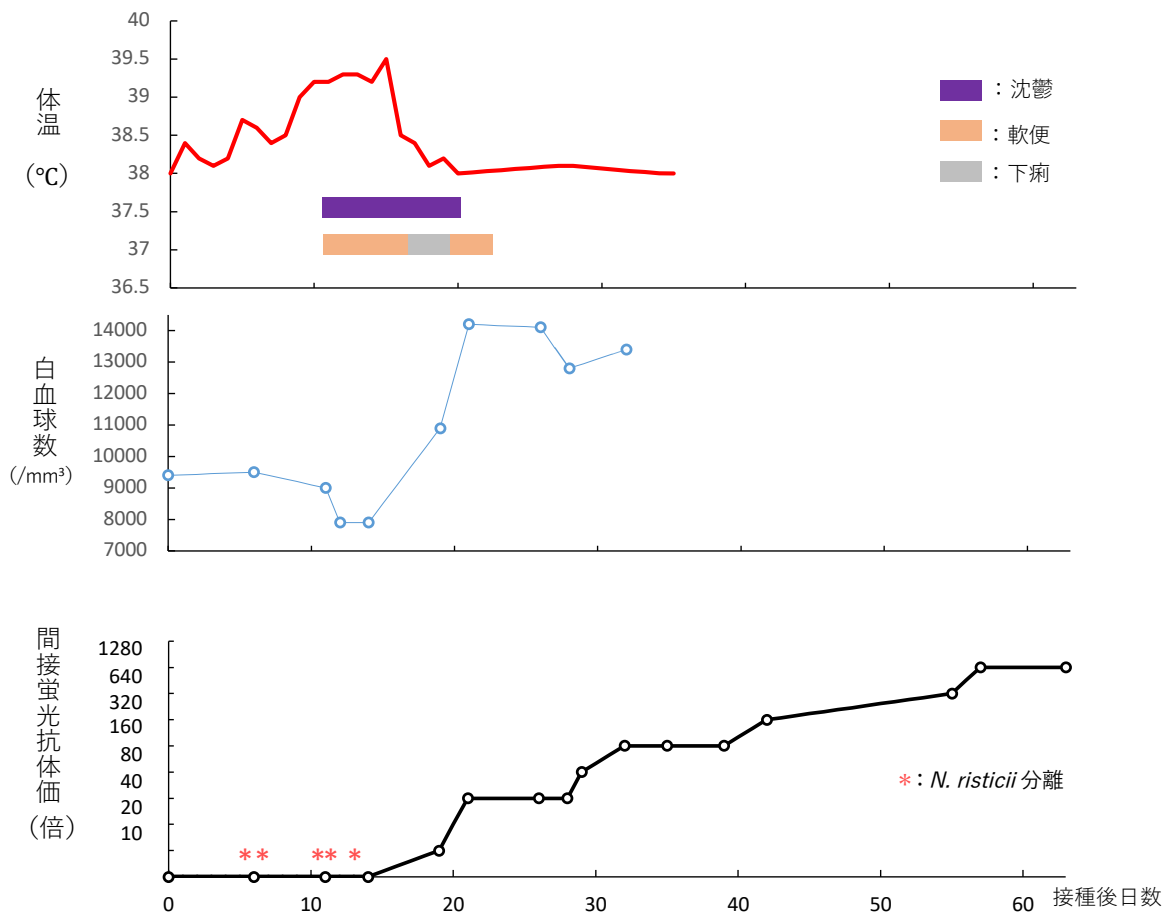
所見	およその割合 (%)
沈鬱	90
食欲廃絶	80
発熱	70
下痢 (軽度)	30
下痢 (水様性)	50
疝痛	30
蹄葉炎	20





写真3 蹄葉炎を発症した自然感染馬 (REED 博士提供)

図3 実験感染馬における臨床血液学的所見および免疫応答



## 2. 臨床血液学的所見

血液検査では、PCVが40～65%に上昇するが、一部の症例では貧血も認められる。また、白血球は初期には減少するが、その後増加する(図3)。血清総蛋白濃度は、初期に上昇するが、その後3～5g/dlの範囲に下降する。

なお、感染馬の末梢血液から白血球を収集し、塗抹標本を作製しても、*N. risticii*が光学顕微鏡下で確認されることはほとんどない。

## 3. 類症鑑別

PHFと類似した馬の下痢症には、サルモネラ感染症、X大腸炎、抗生物質誘発性下痢、エンドトキシンショック、腹膜炎および*Clostridioides difficile*感染症などがあり、類症鑑別が必要である(表4)。とくに成馬のサルモネラ感染症は、PHFときわめて酷似した下痢と蹄葉炎を併発し、急性経過をとることから、サルモネラ感染症が疑われる場合には、糞便材料からの菌分離を行って鑑別する必要がある。

表4 馬の急性下痢症の類症鑑別

病気	(馬)年齢	季節	経過	ストレスの関与
ポトマック熱	成馬	6～10月	急性～亜急性	無
サルモネラ感染症	全馬とくに幼若令馬、まれに成馬	通年とくに暑い時期	急性	可能性有
X大腸炎	成馬	通年	甚急性	有
抗生物質誘発性下痢	成馬	通年	緩徐～亜急性	可能性有
エンドトキシンショック	成馬	通年	甚急性	無
腹膜炎・動脈閉塞症	全馬	通年	緩徐	無
C.difficile感染症	全馬	通年	甚急性	有

## Ⅲ 病理学的所見

### 1. 肉眼所見

肉眼的病変は、ほぼ盲腸と大結腸に限られる。盲腸と結腸の内容物は、非常に水分に富んでおり(写真4)、暗褐色ないし緑色を示すが、重症例では赤褐色となり、悪臭を伴う。粘膜の主な病変は、充血および出血(写真5)で、重症例や長びいた症例では潰瘍が認められる。小腸は、水様性ないし粘稠性内容物を含有し、粘膜面に充血部位や斑状出血巣が認められるが、盲腸や大結腸と比較して軽度である。小結腸には、粘膜の軽度～中等度の充血以外に病変はみられない。

### 2. 病理組織学的所見

病理組織学的には、盲腸および結腸の粘膜上皮細胞の変性・壊死・脱落、腸陰窩における上皮細胞や炎症細胞塊を含む小壊死巣などが認められる(写真6)。粘膜固有層には、多数の好中球、マクロファージ、肥満細胞、形質細胞、リンパ球、好酸球の浸潤がみられる。鍍銀染色によって、上皮細胞や粘膜下織のマクロファージおよび肥満細胞の細胞質内に菌体が観察される。電子顕微鏡観察では、これらの感染細胞の細胞内に多数の*N. risticii*が認められる。

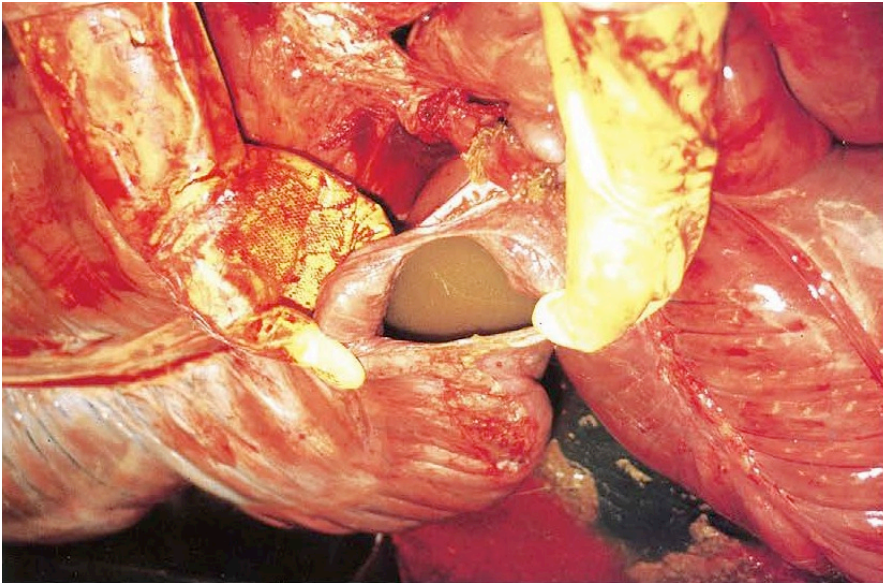


写真4 結腸は水様性内容物で充満している



写真5 結腸粘膜の顕著な出血

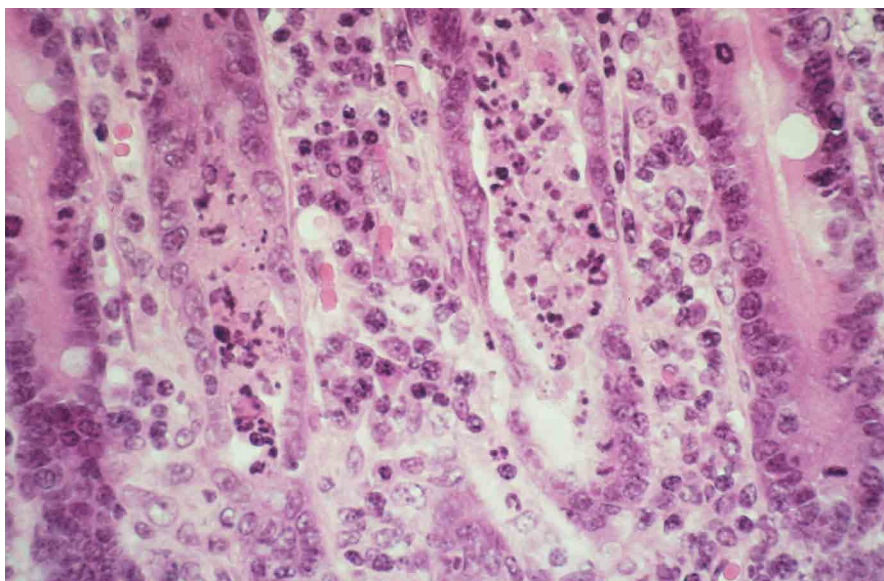


写真6 結腸における粘膜上皮細胞の変性・壊死。腸陰窩には脱落上皮細胞や好中球などを主体とする炎症性細胞が充満している。

## IV 病原体

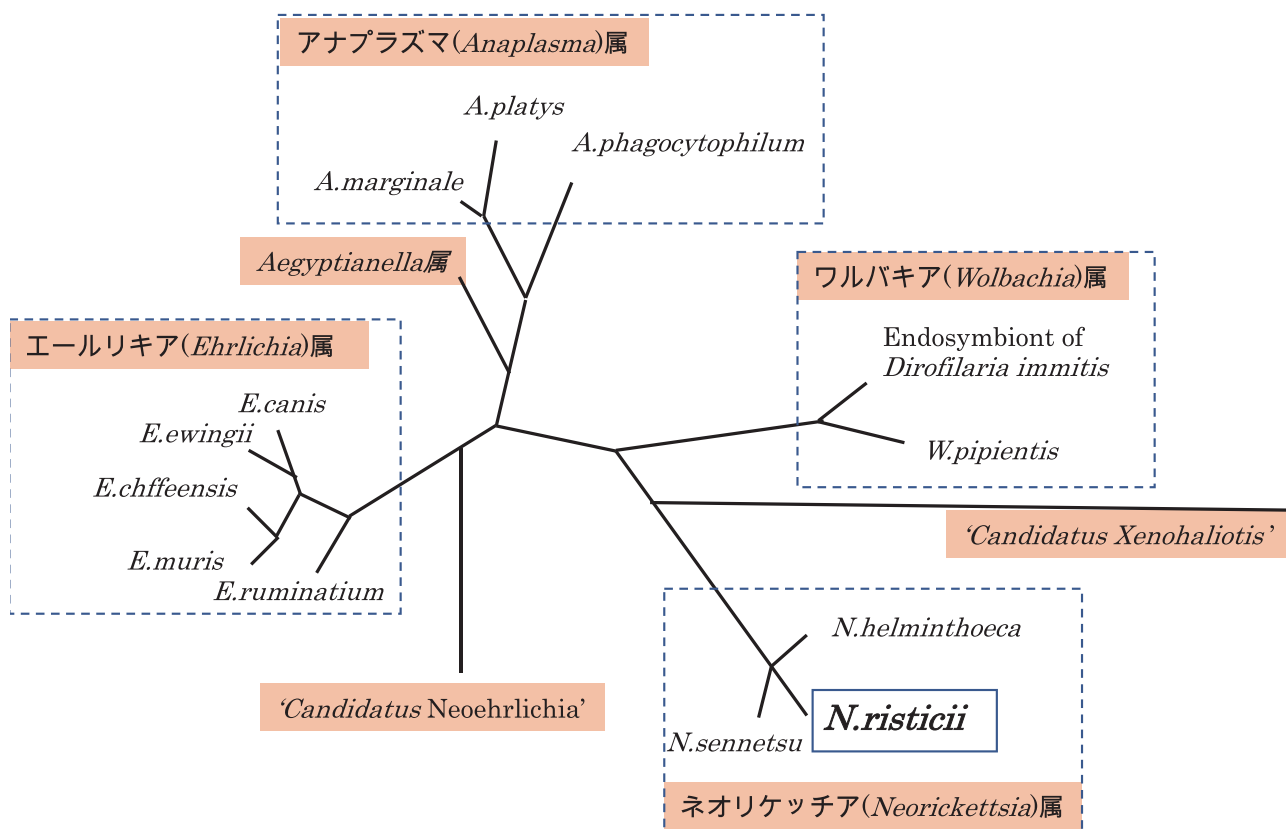
1984年のほぼ同時期に、イリノイ大学のHollandらのグループとバージニア・メリーランド州立大学のRikihiisaらが、感染馬の単球から病原体の分離に成功した。その病原体は、エレキア属のまったく新しいリケッチアで、現在は、分離および同定に功績のあったRisticの名前をとり、*Ehrlichia risticii* (後の *Neorickettsia risticii*) と命名された。

*N. risticii* の分類学的位置を図4に示す。馬に病原性を有するアナプラズマ科のリケッチアには、*N. risticii* 以外に、馬のエレキア症の病原体として以前から知られていた *Ehrlichia Equi* (現在は *Anaplasma phagocytophilum*) があり、黄疸と四肢の浮腫が主徴である。これら2種の病原体は、末梢血中における感染細胞が異なり、*A. phagocytophilum* は、顆粒球に感染する

のに対し、*N. risticii* は、単球に感染する。このことから、Ristic は、*A. phagocytophilum* によって引き起こされる馬のエレキア症を Equine granulocytic ehrlichiosis (馬顆粒球性エレキア症) と呼び、*N. risticii* によって起こる PHF を Equine monocytic ehrlichiosis (馬単球性エレキア症) と呼ぶことを提唱している。

また、人の腺熱は、魚の吸虫(セルカリア)を誤飲して発症するが、その原因となる *Neorickettsia sennetsu* は、*N. risticii* に近縁であり、*N. sennetsu* を実験的に馬へ投与した場合、*N. risticii* に対する抗体価は上昇するものの PHF の発症はしないという報告がある。また、カナダのオンタリオ州では、PHF と同様の症状を示した原因は近縁の *Neorickettsia* sp. であったという報告もある。

図4 リケッチアの分類



## ● 遺伝子情報

*N. risticii* のゲノムは、2009年に公表され、サイズは879kbp、GCは41.3%、遺伝子の長さの平均は841bp、Coding領域は86.9%、ORF数は898、機能の決定したORFは554である。

## 1. 分離と培養

*N. risticii* は、他のリケッチアと同様に人工培地では発育しない。したがって、その分離と培養には、マウスのマクロファージ系腫瘍由来P388D1細胞、ヒトの組織球系腫瘍由来U-937細胞、あるいはイヌの単球培養細胞などが用いられている。培養液としては、通常10%牛胎児血清加RPMI-1640培地が用いられ、これに*N. risticii*の増殖に必須であるL-グルタミンを培養液中に1.0～2.0%の割合で添加する。なお、抗生物質は、*N. risticii*の増殖を抑制するので通常は使用しない。したがって、*N. risticii*の分離、増殖を行うには、完全な無菌操作のできる設備が不可欠である。培養は、5%CO<sub>2</sub>存在下、35～37℃で行う。感染発症馬の白血球(単球)をP388D1細胞やU-937細胞の浮遊液に加えて培養すると、5～10日目には80～100%の感染細胞が得られる。感染細胞は細形化したり、壊死を起こすが、特徴の

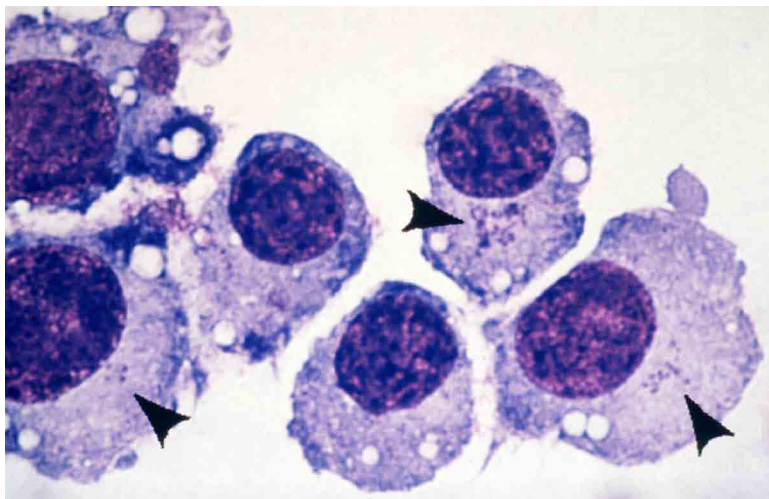


写真7 P388D, 細胞の細胞質内で増殖する *E. risticii*。(ライトギムザ染色)

ある細胞変性効果は認められない。ライトギムザ染色標本では、感染細胞の細胞質に数個～約百個の病原体からなる封入体が認められる(写真7矢頭)。

## 2. 形態

*N. risticii* は、グラム染色で陰性に、ライトギムザ染色で青紫色に(写真7)、ギムザ染色で赤紫色に染まる。多形性で、円形、卵形、ソーセージ様の形態を示し、莢膜や鞭毛は無い。電子顕微鏡観察では、2層の細胞膜と波状の外膜を有し、グラム陰性菌の形態を示す。内部は高い電子密度を有し、DNAやリボゾームに富んでいる。大きさは0.4-0.75 $\mu$ m×0.5-1.2 $\mu$ mである(写真8)。

## 3. 血清学的性状

*N. risticii*の血清型について詳細に検討した報告はないが、現在までのところ、血清学的には一つの型と考えられている。*N. risticii*は、間接蛍光抗体法(Indirect fluorescent

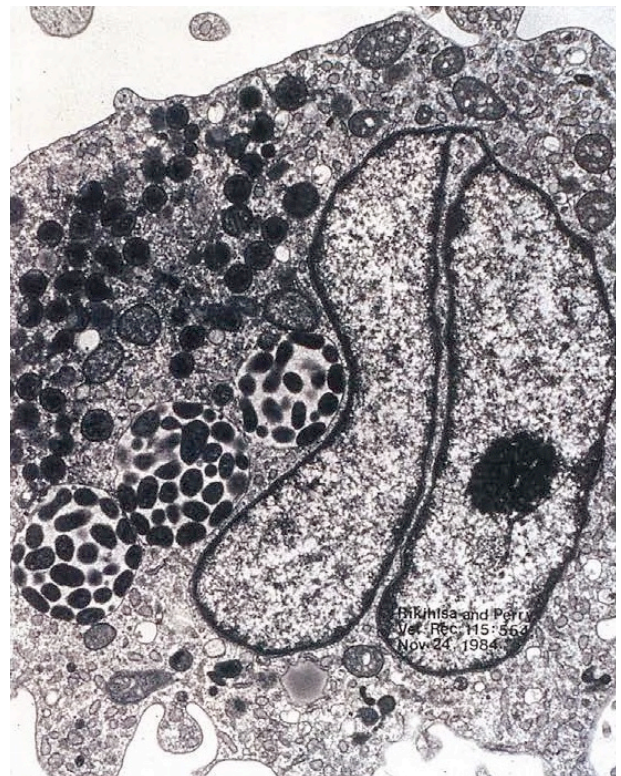


写真8 P388D, 細胞質内に認められる多数の *E. risticii*。(RIKIHISA 博士提供)

antibody test:IFA 法) で、*E. equi* (現在は *A. phagocytophila*) とは全く交差反応を示さないが *N. sennetsu* とは比較的強く、*E. canis* とは弱いながら交差反応を示す。

#### 4. 病原性

*N. risticii* は、あらゆる品種の馬に対して病原性を有するものと考えられている (臨床症状および病理学的所見参照)。実験動物としては、

マウス (CF-1 系) が高い感受性を示し、*N. risticii* を腹腔内接種されたマウスは昏睡、粗毛、やぶにらみ、背中を丸めるなどの症状を示し、末期には下痢を呈する。その他の実験動物では、*N. risticii* を実験的に接種されたネコの一部が下痢を発症したと報告されている。また、イヌは、臨床的には異常を示さないが、病原体は血液中で増殖することが明らかにされている。

## V 診断

PHF の確定診断は、病原学的または血清学的に診断する。AAEP ガイドラインを参考に診断サンプルおよび検査方法、取扱を表 5 に示す。

### 1. 病原学的診断

病原学的診断は、細胞培養法およびマウス接種法によって行われていた。近年は、遺伝子検査が迅速診断法として用いられている。

#### 1) 細胞培養法

細胞培養法による *N. risticii* の分離は、つぎのようにして行う。感染発症馬の急性期の血液は抗凝固剤を用いて採取し、1～2 時間放置した後に白血球層 (buffy coat) を取るか、あるいは密度勾配法を用いて単球層を分離する。この白血球を培養用フラスコにて 1 日培養 (培養液は前述の 10% 牛胎児血清加 RPMI

– 1640) すると、単球が底に付着し、単層培養の状態となる。培養後 2 日目に、P388D1 細胞などを加えて分離培養を続け、5～10 日目に形態学的に検査する。形態学的検査は、通常、培養細胞の塗抹標本をギムザ染色し、光学顕微鏡下で菌体の増殖を確認する (写真 9)。*N. risticii* の同定には、IFA 法による免疫学的診断が必要である。

#### 2) マウス接種法

マウス接種法は、感染発症馬の全血または白血球を成熟したマウス (CF-1 系) の腹腔内に接種し、その臨床経過や病理所見から、PHF の可能性を検査する。本病の可能性が疑われた場合には、病理解剖によって摘出したマウス脾臓等の乳剤を用いて、病原体を分離するか、あるいは IFA 法 (二次反応には抗マウス IgG 血清

表 5 診断用サンプルおよび検査、取扱 (AAEP ガイドライン参照)

サンプル	検査	輸送形態	取扱
新鮮便	PCR	防漏型容器	すべて冷蔵 1 日以内が望ましい
全血	細胞培養法 マウス接種法 PCR	EDTA 管	
血清	IFA	プレーン管、防漏型容器	
大腸組織；盲腸	PCR	防漏型容器	
流産胎仔	PCR	防漏型容器	

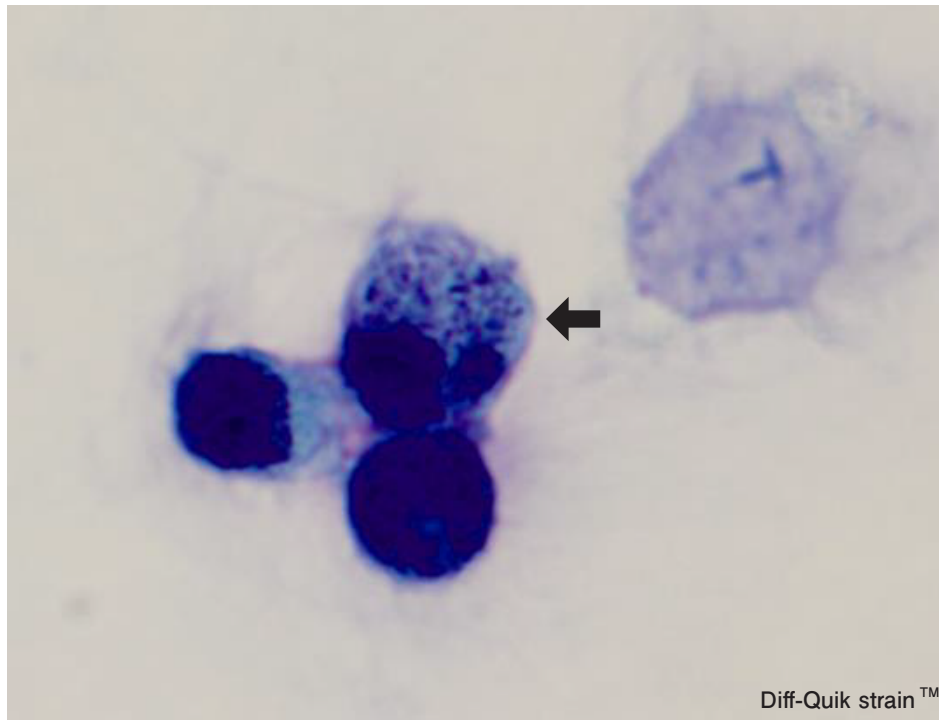


写真9 培養細胞 (P388D1) の塗抹標本  
細胞質内に *N. Risticii* のギムザ陽性像が確認できる

を使用) によってマウス血清中に抗体を証明することによって確定診断する。

### 3) PCR 検査

迅速かつ高感度で PHF を診断できる方法として、いくつかの遺伝子検査法 (PCR 法、Real-time PCR 法) が報告されている。一般に米国では nested PCR 法が感度の良い方法として実施されている。より新しい方法として、*N. risticii* の 16SrRNA 遺伝子の 85bp を標的とした表6のプライマーセットを用いた Real-time PCR 法も実施されている。

表6 *N.risticii* 特異的 real-time PCR 法

	配列
Forward	GTTATTCCCTACTACCAGGCAAGTTC
Reverse	AACGGAATCAGGGCTGCTT
Probe	ACGCACCCGTCTGCCACGGGA

## 2. 血清学的診断

血清学的診断には、IFA 法、ELISA 法、ラテ

ックス凝集反応などがある。現在のところ、一般的には、IFA 法が使用されており、一部の実験室では ELISA 法も実用化されている。ラテックス凝集反応は、特異性のないことが指摘され、今では使用されていない。IFA 法は、発症初期の診断法としてはあまり有効ではないが、発症後期から回復期にかけては確実な診断が可能である。IFA 法抗原は、*N. risticii* を感染させた P388D1 細胞の濃厚浮遊液をスライドガラス (12 穴のホール・スライドガラス) 上に滴下して、37℃、1 時間乾燥後、アセトン固定した固着標的抗原である。この抗原に対し、被検血清 (一次反応)、ついで蛍光抗体液 (蛍光標識抗ウマ IgG 山羊血清: 二次反応) という順序で反応させ、蛍光顕微鏡で観察する (写真10)。IFA 価の陽性限界は 80 倍以上であるが、Prepzman らは、80 倍以下でも PHF と考えられる例が少数検出されることから、陽性限界を 64 倍とすることを提案している。実験感染馬では、IFA 価の上昇は接種後 9 ~ 20 日目に認められ、ピークが接種後 4 週間前後で、80 倍以上の値が 1 年以上にわたって維持される。

## 間接蛍光抗体法の術式

### A. 準備するもの

- 1) 固着標的抗原 (12 穴スライドグラス)
- 2) 被検血清
- 3) 標準陽性血清
- 4) 蛍光標識抗ウマ IgG 山羊血清
- 5) 96 穴マイクロタイター・プレート  
(血清希釈に用いるもので、小試験管等で代用できる)
- 6) 血清分注器 (10 $\mu$ l、100 $\mu$ l)
- 7) リン酸緩衝液 (PBS) : 150ml  $\times$  4 個
- 8) [1% Evans Blue] ※蛍光顕微鏡を使用する場合は省略可能。
- 9) 反応箱
- 10) 孵卵器
- 11) 蛍光顕微鏡

### B. 被検血清の希釈

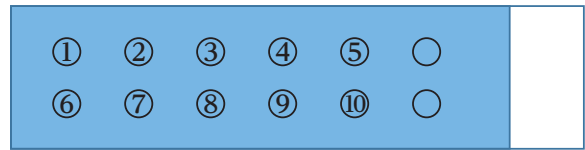
被検血清の段階希釈液を得る。ここでは 96 穴マイクロタイター・プレートを利用した 20 倍～12,400 倍までの希釈方法を述べる。

- 1) 96 穴マイクロタイター・プレートの縦第 1 列に 190 $\mu$ l のリン酸緩衝液 (PBS) を入れる。
- 2) 96 穴マイクロタイター・プレートの縦第 2～10 列に 100 $\mu$ l の PBS を入れる。
- 3) 10 $\mu$ l の被検血清を第 1 列に入れてよく混和する (20 倍希釈血清)。
- 4) 第 1 列から 100 $\mu$ l をとり、第 2 列に入れてよく混和する。以下、第 10 列 (12,400 倍希釈) まで同様に繰り返し、段階希釈する。
- 5) 第 10 列では 100 $\mu$ l をすてる。

### C. 反応法

- 1) あらかじめ作製された固着標的抗原を冷蔵庫 (4 $^{\circ}$ C) から取り出す。このとき抗原表面の結露を防ぐため、乾燥剤を入れた小箱の中で室温にもどす。

- 2) 抗原①～⑩の穴に、各濃度に希釈された被検血清の 10 $\mu$ l を滴下する (下図)。第 10 列の穴からスタートする。



- 3) 10 $\mu$ l の標準陽性血清を○○に入れる。
- 4) 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。
- 5) 洗浄。
  - ① PBS (150ml に Tween20 を 2 滴添加) ..... 10 回すすぐ
  - ② PBS (150ml に Tween20 を 2 滴添加) ..... 10 回すすぐ  
[PBS (150ml + Evans Blue 2～3 滴) 直ちに除去]
  - ③ PBS (150ml) ..... 5 分
- 6) 余分の水分を濾紙で吸い取る。乾燥させてはならない。
- 7) 蛍光標識 Anti-Horse IgG の 10 $\mu$ l による二次反応。37 $^{\circ}$ C、30 分。
- 8) 洗浄
  - ① PBS (150ml に Tween20 を 2 滴添加) ..... 10 回すすぐ
  - ② PBS (150ml に Tween20 を 2 滴添加) ..... 10 回すすぐ
  - ③ PBS [150ml に Evans Blue 2～3 滴添加] ..... 3 分間おく
  - ④ PBS (150ml) ..... 5 分
- 9) 余分な水分を濾紙で吸い取る。乾燥させてはならない。
- 10) カバーグラスでマウント (緩衝グリセリンを用いて封入)
- 11) 鏡検 (写真 10, 11) [Evans Blue を使用した場合は対比染色によって細胞質が橙色に染まる (写真 12)]



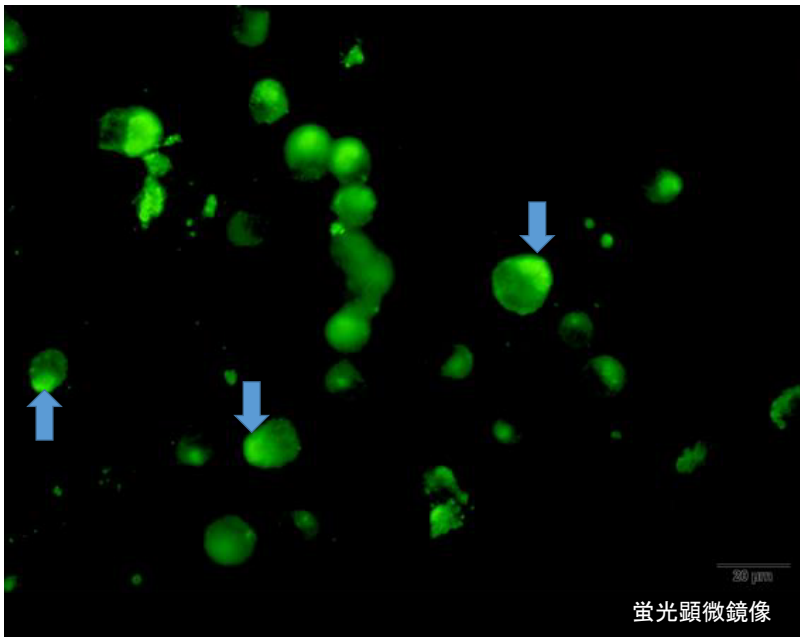


写真 10  
 単球の細胞質内に認められる陽性像  
 (矢印：発光部) 【蛍光顕微鏡像】

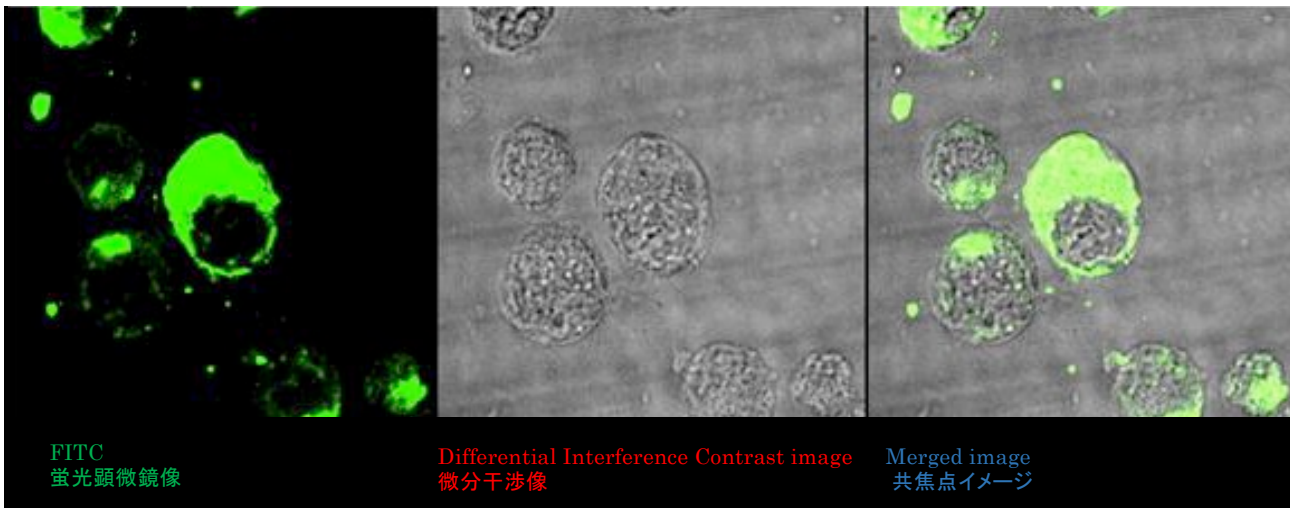


写真 11 *N. risticii* は単球の細胞内に局在 【共焦点レーザー顕微鏡像】

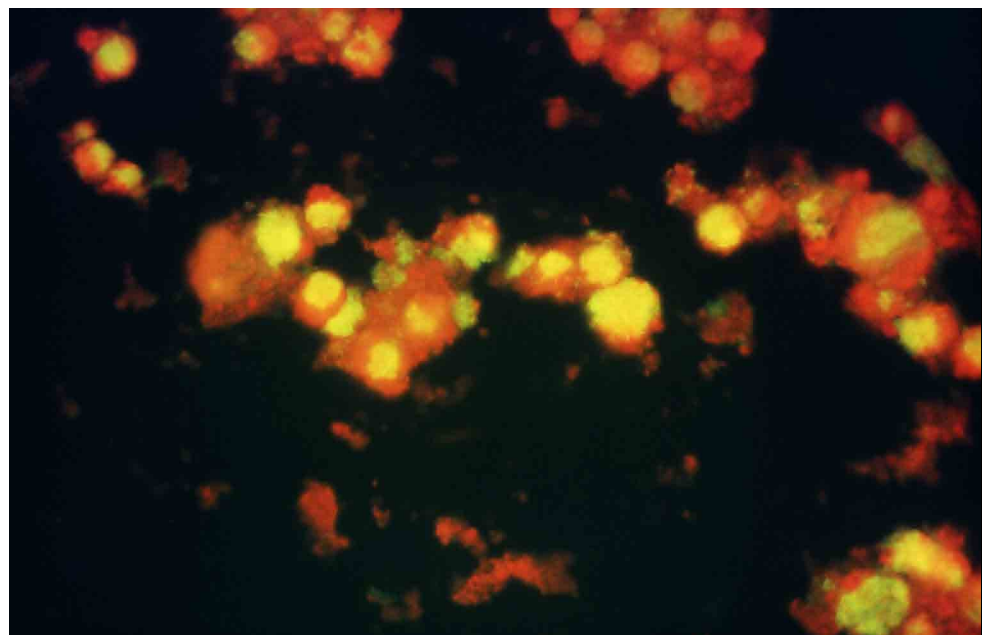


写真 12  
 Evans Blue 対比染色による陽性所見。細胞質が  
 橙色に染まり、*N. Risticii*  
 は蛍光色（緑）に発色

## Ⅵ 治療と予防

### 1. 治療

PHFの特効薬は、テトラサイクリン系抗生物質である。オキシテトラサイクリンの静注やミノサイクリンあるいはドキシサイクリンの経口投与が行われている。その効果は劇的で、多くの罹患馬は投与開始後2日目には症状が改善される。対症療法として、下痢による衰弱を軽減することと蹄葉炎の発生を防止するため、乳酸リンゲルや重曹水などの補液や各種の消炎剤が投与される(表7)。症状が改善されない場合には、サルモネラ感染症など他の原因が疑われるので抗生物質の変更など、迅速な対応が必要である。

表7 治療

抗生物質		
Oxtetracycline	7mg・kg	IV (24時間毎 3~5日間)
解熱・鎮痛・消炎剤		
Diprone	7.5g	IV
Banamine	250~500mg	IV
補液		
Ringer液、等	3.8ℓ以上	IV
胃洗浄		
Mineral Oil	2.8ℓ	経鼻投与
Water	2ℓ	経鼻投与

### 2. 予防

米国では、予防にワクチンが実用化されている。市販されているワクチンは不活化ワクチン(Equine Potomavac.: Boehringer Ingelheim)で、頸部の筋肉内に1mLを2~4週間隔で2回接種する。ただし、自然発生例の株間の抗原性に多様性があることから、このワクチンの感染防御効果は、あまり良好ではないとも言われている。流行地域では馬房内は夜間消灯するなど水生昆虫の摂取を最小限にする厩舎衛生害虫の防除対策、感染馬の隔離などが行われている。

## おわりに

馬のポトマック熱は、1979年に初めて報告された馬属特有の疾病であり、この初版刊行時は感染経路をはじめとして不明な点が多い病気でした。和田氏は、初版で『IFA法は急性期の診断には役立たない。感染経路、ベクターの役割と特定、病理発生、保菌馬の存否、感染防御抗体の持続期間、細胞性免疫と液性免疫の役割などの事項が未解決であり、このような問題に対する研究が推進されることを期待したい。』と記していました。

30年が経過した現在、PCR法により急性期の診断が可能となり、感染経路に水生動物や吸虫が関連していることなど、多くの進展がありました。また、新たな国での発生報告や新種の病原体発見など、近年でも新事実が判明しています。幸い、わが国では本病の報告はありませんが、鳥が *N. risticii* の運び屋になっていることから、今後本病が発生する可能性は否定できません。

最後に、馬ポトマック熱に関する研修において、和田氏に種々の実験と貴重な体験の機会を与えていただき、さらにはこの改訂版においてもご助言ご指導して下さいました米国オハイオ州立大学、力久泰子先生に厚くお礼申し上げます。

令和2年12月

日本中央競馬会  
競走馬総合研究所 微生物研究室

日本中央競馬会畜産振興事業

地方競馬全国協会畜産振興事業

平成 2 年 3 月 第1版第1刷発行

平成13年 3 月 第1版第2刷発行

令和 2 年12月 第2版第1刷発行

## 公益社団法人 中央畜産会

〒101-0021 東京都千代田区外神田2-16-2

第2ディーアイシービル9F

TEL. 03-6206-0832